

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP03/10765

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

26.08.03

REC'D 10 OCT 2003

WFO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月26日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-245905
[ST. 10/C]: [JP2002-245905]

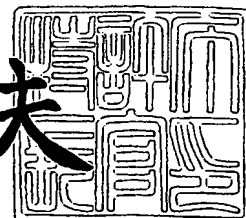
出 願 人
Applicant(s): 科学技術振興事業団

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 NP02082-NT

【提出日】 平成14年 8月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 G01N 33/50

【発明の名称】 核酸回収チップと核酸回収装置

【請求項の数】 7

【発明者】

 【住所又は居所】 東京都江東区潮見 2 - 8 - 1 4 - 1 0 1 4

 【氏名】 安田 賢二

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県鶴ヶ島市上広谷 3 4 3 - 5 - 3 0 2

 【氏名】 一木 隆範

【発明者】

 【住所又は居所】 埼玉県志木市本町 5 - 1 7 - 2 - 4 0 2

 【氏名】 岡野 和宣

【特許出願人】

 【識別番号】 396020800

 【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

 【識別番号】 100093230

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 西澤 利夫

 【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 009911

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0013341

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸回収チップと核酸回収装置

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 透明基板上に電気伝導性領域が配置され、この領域の上に核酸結合部と細胞収容容器部が配設された細胞中の核酸回収チップであって前記の電気伝導性領域に電位を印加する手段と、細胞収容容器部中で細胞が培養される手段とが具備されているとともに、前記の電気伝導性領域は、特定の波長の光に対して吸収を有し、この特定波長の光が照射されることで局所的に発熱し、電気伝導性領域上に結合した核酸成分が局所的に解離・回収されるようにしたことを特徴とする核酸回収チップ。

【請求項 2】 電気伝導性領域に電位を印加する手段として、電気伝導性領域とこれに対向配置された上部電気伝導性部とを有していることを特徴とする請求項 1 の核酸回収チップ。

【請求項 3】 細胞収容容器部中で細胞が培養される手段として、細胞収容容器部を内包して、細胞培養液の流通を可能とした箱体容器部が具備されていることを特徴とする請求項 1 または 2 の核酸回収チップ。

【請求項 4】 一細胞を収容する細胞収容容器部が 1 以上配設されていることを特徴とする請求項 1 ないし 3 のいずれかの核酸回収チップ。

【請求項 5】 請求項 1 ないし 4 のいずれかの核酸回収チップを備えた核酸回収装置であって、核酸回収チップの電気伝導性領域に特定波長の光を照射して局所的に加熱させる光学系とともに、この領域に電位を印加する電源系を有していることを特徴とする核酸回収装置。

【請求項 6】 細胞の状態を観察する観察系を有していることを特徴とする請求項 5 の核酸回収装置。

【請求項 7】 細胞の培養液の流通系を有していることを特徴とする請求項 5 または 6 の核酸回収装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、細胞を培養しながら観察し、細胞が特定の状態になったところで細胞中の特定領域の核酸成分を選択的に分離し、回収する核酸回収チップと核酸回収装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、生体関連試料としてのDNA や核酸、さらにはタンパク質についての効率的で、しかも高精度な分離、分析のための手法、手段の開発が急速に進展している。

【0003】

たとえば周知のDNA チップはマイクロパターニングの技術とDNA の相補性とを利用し、特定の塩基配列を検出する手法である。このものは、基板上に様々な配列を持つオリゴヌクレオチドをアレー上にパターニングしておき、DNA 試料が基板上の結合位置を検出し、試料中のDNA の持つ配列を解析するものである。また、PCR反応はDNA 二本鎖の解離（95℃、30秒間）、オリゴヌクレオチドとのアニーリング（37℃、20秒間）、DNA ポリメラーゼによる相補鎖合成（72℃、2分間）の三反応の繰り返しからなり、微量なDNA 断片を数十万倍に増幅させる技術であることがよく知られている。一方、流体中の局所領域において温度上昇を発生させる技術として光を用いる方法がある。光吸収を持つ微粒子をレーザートラップすることにより微粒子周辺の μm オーダーの微小領域に局所的な温度上昇を発生させ、タンパクサブユニット会合体を切断する技術について、鷺津らが静電気学会講演論文集（1994年）111頁から114頁に報告している。またこの出願の発明者らは、先に特願平10-163214として、基板上の複数の領域に、各々異なった核酸プローブを固定し、これに試料DNA中の相補鎖DNAを結合させた後、集束光の熱によって局所的に相補鎖DNAを解離させ回収する装置と方法を提案している。

【0004】

他方、培養細胞の溶液環境と、細胞間の物理的接触を制御しながら培養する公知例は無い。そこで発明者らは、これらの問題点を解決し、新たに特定の一細胞のみを選択し、その一細胞を細胞株として培養する技術、および細胞を観察する

場合に、細胞の溶液環境条件を制御し、かつ、容器中での細胞濃度を一定に制御する技術、あるいは相互作用する細胞を特定しながら培養観察する技術を発明し特願 2000-356827として出願している。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、従来のDNAチップによる遺伝子解析技術では、基板上に形成された20塩基ほどのプライマーと試料中のDNA / RNAの一本鎖を相補的に結合させることにより捕獲し、観察することに重点が置かれてきており、特定の細胞状態（細胞周期内の特定の時期）におけるmRNAの細胞内分布や組織中の各細胞単位での細胞内の核酸成分の分析技術については考慮されていないのが実情である。そして、このことは、従来の各種の生体関連試料の分離、分析方法（装置）について同様であった。

【0006】

生命体の構成やその活動等について解析するためには、前記のとおり、特定の細胞状態での特定領域の核酸成分の分離、分析が欠かせないのであるが、このための手段についての検討はほとんど進んでいない。

【0007】

そこで、この出願の発明は、特定の状態にある細胞内の核酸成分の分布あるいは組織細胞集団中の各細胞内の核酸成分の分布を明らかにするために、特定の細胞状態の各細胞の特定領域の核酸成分を選択的に分離し、回収することのできる新しい技術手段を提供することを課題としている。

【0008】

【課題を解決するための手段】

この出願の発明は、上記の課題を解決するものとして、第1には、透明基板上に電気伝導性領域が配置され、この領域の上に核酸結合部と細胞収容容器部が配設された細胞中の核酸回収チップであって前記の電気伝導性領域に電位を印加する手段と、細胞収容容器部中で細胞が培養される手段とが具備されているとともに、前記の電気伝導性領域は、特定の波長の光に対して吸収を有し、この特定波長の光が照射されることで局所的に発熱し、電気伝導性領域上に結合した核酸成

分が局所的に解離・回収されるようにしたことを特徴とする核酸回収チップを提供する。

【0009】

また、この出願の発明は、第2には、電気伝導性領域に電位を印加する手段として、電気伝導性領域とこれに対向配置された上部電気伝導性部とを有していることを特徴とする核酸回収チップを提供し、第3には、細胞収容容器部中で細胞が培養される手段として、細胞収容容器部を内包して、細胞培養液の流通を可能とした箱体容器部が具備されていることを特徴とする核酸回収チップを、第4には、一細胞を収容する細胞収容容器部が1以上配設されていること特徴とする請求項1ないし3のいずれかの核酸回収チップを提供する。

【0010】

そして、この出願の発明は、第5には、前記にいずれかの核酸回収チップを備えた核酸回収装置であって、核酸回収チップの電気伝導性領域に特定波長の光を照射して局所的に加熱させる光学系とともに、この領域に電位を印加する電源系を有していることを特徴とする核酸回収装置を提供し、第6には、細胞の状態を観察する観察系を有していることを特徴とする核酸回収装置を、第7には、細胞の培養液の流通系を有していることを特徴とする核酸回収装置を提供する。

【0011】

【発明の実施の形態】

この出願は上記のとおりの特徴をもつものであるが、以下にその実施の形態について説明する。

【0012】

まず、この出願の発明の核酸回収チップの基本構成の一例を図1の実施例を用いて説明する。核酸回収チップ100で、スライドガラス等の光学的に透明な基板101上に、クロムの蒸着層などの光学吸収を持つ薄膜層102が配置されている。透過光で観察をする場合には、薄膜層102の膜厚は、光を完全に吸収しない程度でかつむらの無い程度の薄いものであることが望ましい。例えば、クロムの場合には、膜厚50Åで蒸着すれば可視領域の透過光70%程度であり、この発明の用途に用いるのに支障ない。その他、Ti, V, Fe, Co, Ni, Mo, Wの

いずれかの金属を用いてもよい。これらの金属は、金属層の表面にできた酸化物質がシラノール基と共有結合することで、基板表面に核酸プローブ層 113 を固定することができる。吸光薄膜層 102 の上には、細胞 104 を培養するための容器の壁 103 が積層されている。容器の大きさや配置は、細胞の種類に応じて適宜選択するが、たとえば、神経細胞の場合、幅 $50\ \mu\text{m}$ 程度以上であることが望ましい。また、各容器の間に細胞は移動できないが、軸索等が他の細胞に接合できるように経路 110 を空けておいてもよい。また、容器の壁 103 の高さは細胞が乗り越えない程度の高さを持つ必要がある。たとえば神経細胞の場合には、高さ $20\ \mu\text{m}$ 以上あればよい。特に容器の壁 103 の素材がアガロースを用いた場合には、細胞との接着性も無く、また、細胞に対してのシグナル物質でもないことから細胞にとっては無害なだけでなく、培養実験データへの影響が小さく最適である。細胞 104 を培養するとき、培養液の循環が必要な場合には、容器の壁 103 を含む細胞培養領域をすべて覆う構造の光学的に透明な容器 106 を被せて、管 107 から溶液を導入し、管 108 から廃液を回収すればよい。このとき、電極となる領域 102 と対になるように、導電性を持つ領域 109 を容器 106 内上面に付加する。この領域 109 の厚さは、領域 102 と同様に光透過性を有する程度に薄く蒸着する。ここで容器 105 内の細胞の様子は対物レンズ 112 を用いて連続観察することができる。また、対物レンズを通じて近赤外光の集束光を基板表面に照射することで、局所的に加熱して、前記核酸プローブ層 113 と結合した核酸成分を選択的に熱変性させて回収することができる。電源モジュール 111 を用いて領域 102 と領域 109 の間に電界を印加することができる。またこの実施例では、領域 102 が 1 枚の電極として構成されているが、各細胞容器ごとに独立して動作する複数の電極アレイを用いてもよい。

【0013】

図 2 は、この出願の発明の核酸回収チップを用いた細胞中の核酸回収手順を例示した模式図である。図 2 (1) は、細胞を導入する前の基板表面の状態を示した模式図である。基板表面 201 には核酸成分を捕獲するために核酸プローブ 202 が固定されている。ここで、核酸プローブ 202 としては、mRNA を選択的に回収するために p o l y - T を中心とした配列で構成してもよいし、特定の

核酸成分を回収したい場合は、特定の核酸成分に相補的な配列で構成してもよいし、あるいは、複数の異なる配列の核酸プローブを混合して配列させてもよい。図2(2)は、前記基板表面201上に細胞203が配置されている様子を示した模式図である。細胞203の状態を顕微鏡観察しながら特定の細胞状態となったときに、顕微鏡対物レンズを通じて照射した赤外線集束光によって細胞を破碎してもよいし、各細胞培養容器の電極が独立している場合は、電極に直流あるいは交流の電場を印加して細胞を破碎してもよい。あるいは一斉にすべての容器の細胞を破碎する場合は、界面活性剤等の薬剤を導入することで細胞を破碎してもよい。図2(3)は、細胞破碎後の細胞内タンパク質と核酸成分との分離手順を示した模式図である。基板表面201と対極との間に直流電界を印加することで、タンパク質成分と核酸成分とを分離する。タンパク質と核酸成分とで等電点が大きく異なっているため、核酸成分のみを基板表面201に引き寄せ、基板表面からタンパク質成分204を遊離させて溶液を流して排除することができる。また、細胞中の核酸成分を、基板表面201上に2次元に射影したかたちで固定することができる。図2(4)は、その後、先ほどとは反対の直流電界を印加して、基板表面の核酸プローブ205と結合しなかった核酸成分206を除去することができることを示している。図2(5)は、次に集束光加熱によって核酸プローブと結合した細胞内核酸成分を局所的に解離させ回収する手順を示した模式図である。対物レンズ207によって照射した集束光によって加熱した領域208の核酸プローブに結合した核酸試料209のみが選択的に溶液中に解離することから、この領域の解離した核酸成分を含む溶液を回収することで細胞内の特定領域の核酸成分の選択回収が可能となる。

【0014】

図3は、この出願の発明の核酸回収チップを用いる光学系および溶液送液系の1実施例としての装置構成を模式的に例示したものである。この装置では細胞等の試料を核酸回収チップ100で培養しながらその状態変化を観察するために、顕微鏡観察系、培養液循環系を、同時に核酸回収チップ100上の核酸を選択回収させるために集束光照射系を持っている。図3からもわかるように顕微鏡観察光学系の光路上に核酸回収チップ100を配置しており、この核酸回収チップ10

0 に溶液を供給する培養液供給・廃棄部が連結されている。まず、顕微観察光学系は、以下のような構成になっている。光源 301 から照射された光は、フィルター 302 で特定の波長に調整され、コンデンサレンズ 303 によって集光されて、核酸回収チップ 100 に照射される。照射された光は、透過光として対物レンズ 305 での観察に用いられる。核酸回収チップ 100 内部の透過光像は、ミラー 311 によってフィルタ 312 通過後、カメラ 313 に誘導され、カメラの受光面に結像する。従って、核酸回収チップ 100 の素材は、フィルタ 302 で選択された波長の光に対して、光学的に透明な素材であることが望ましい。具体的には、ホウケイ酸ガラス、石英ガラス等のガラスや、ポリスチレン等の樹脂やプラスチック、あるいはシリコン基板等の固体基板および、アガロース等の高分子を用いる。また特にシリコン基板を用いる場合は波長 900 nm 以上の波長の光を観測に用いる。また、図1 の吸光層 102 のところで述べたように、光の吸収が前記特定の波長において 80 % 未満となるような膜厚あるいは吸収を持たない波長を選択的に用いることが望ましい。

【0015】

また、光源 308 から照射された光も、フィルター 309 で波長選択された後に、ダイクロイック・ミラー 310 によって対物レンズ 305 に誘導され、核酸回収チップ 100 内部の蛍光観察の励起光として用いられる。核酸回収チップ 100 から発した蛍光は再度対物レンズ 305 によって集光され、フィルター 312 によって励起光をカットした後の蛍光と透過光のみをカメラ 313 で観察することができる。このとき、フィルター 302、309、312 の組み合わせを調整することで、透過光のみをカメラ 313 で観察したり、あるいは蛍光のみを観察したり、透過光像と蛍光像を同時に観察することも出来る。光路内には、レーザー光源 307 で発生させたレーザー光を可動ダイクロイック・ミラー 306 によって対物レンズ 305 に導入する機構も備わっている。このレーザーは対物レンズ 305 によって集束光となり、核酸回収チップ 100 を局所的に加熱することができる。集光点を移動させる場合には、可動ダイクロイック・ミラーを移動させることで、核酸回収チップ 100 内でのレーザーの集束位置を動かすことが可能である。このレーザーの波長としては、水の吸収を持たず、光化学作用を持

たない波長が望ましい。たとえばNd:YAGレーザーの1064nmなどでは、水、ガラス、アガロース等に対して顕著な吸収はなく、選択的にクロム薄膜層のみでレーザー光吸収が起こり、光が吸収されたクロム薄膜層の光集束点近傍のみで局所的に発熱する。

【0016】

カメラで得られた画像データは画像処理解析装置314によって解析され、さまざまな解析結果を基に可動ダイクロイック・ミラー306や、核酸回収チップ100が載っている温調機能付可動XYステージ304の位置を制御するためにX-Y方向に自在に移動させるステージ移動用モーター315を駆動することができる。これによって細胞の形状を認識したり、認識後にその細胞を追跡し、つねに画像の中心に位置させたり、対物レンズとの距離を調節することで画像のピントを特定の細胞に合わせたりすることが可能となる。あるいは、一定時間の周期で可動ダイクロイック・ミラー306や、培養マイクロチャンバ100が載っている温調機能付ステージ304を制御したり、一定間隔でステージ移動用モーター315を駆動することができる。

【0017】

培養液供給・廃棄部について説明すると、。核酸回収チップ100に複数の種類の種類、濃度の異なる培養液あるいは細胞破碎用の試薬等を細胞の状態に応じて溶液槽316から供給装置317によって供給された培養液は、供給装置内の温度調節機構によって液温を調節され、さらに溶存空気交換機構によって溶存気体の成分が調整され、流速を調節されながら核酸回収チップ100に培養液等の試薬を供給する構造になっている。容器100の培養液はまたPCR反応機能つき分配器318によってPCR反応増幅した後にキャピラリー電気泳動装置319に導入して核酸回収チップ100から供給された試料核酸の配列を調べたり、あるいは廃液を廃液溜320におくることができる。

【0018】

もちろん、この出願の発明は以上の例に限定されることなしに、その細部について様々な形態が可能であることは言うまでもない。

【0019】

【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、培養している細胞の特定の状態での核酸成分の空間分布を解析することが可能となる。

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

この出願の発明の核酸回収チップの基本構成の一例を示す実施例の模式図である。

【図 2】

この出願の発明の核酸回収チップを用いた細胞中の核酸回収手順を例示した模式図である。

【図 3】

この出願の発明の核酸回収チップを用いる光学系および溶液送液系の 1 実施例を例示したの模式図である。

【符号の説明】

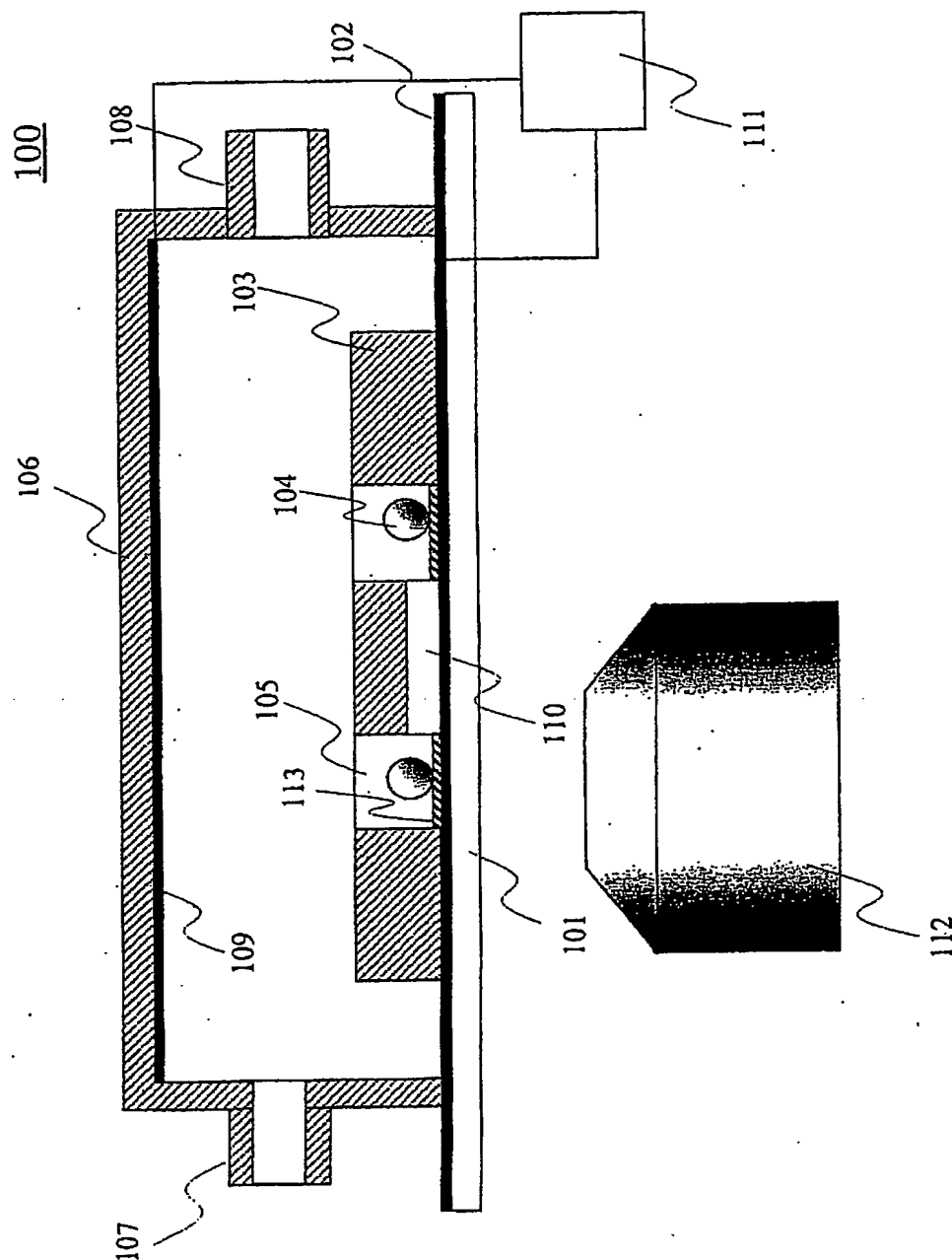
- 100 核酸回収チップ
- 101 光学的に透明な基板
- 102 光学吸収を持つ薄膜層
- 103 光学的に透明で、細胞等に対して毒性を持たない物質の壁
- 104 細胞等の試料
- 105 細胞容器
- 106 光学的に透明な容器
- 107、108 管
- 109 導電性を持った層
- 110 トンネル
- 111 電源モジュール
- 112、207、305 対物レンズ
- 113 核酸プローブ
- 201 基板表面
- 202 核酸プローブ

- 203 細胞
- 204 タンパク質
- 205 核酸プローブ
- 206 209 核酸
- 208 局所加熱領域
- 301 光源
- 302、309、312 フィルター
- 303 コンデンサレンズ
- 304 温調機能付ステージ
- 306 可動ダイクロイック・ミラー
- 308 光源
- 310 ダイクロイック・ミラー
- 311 ミラー
- 313 カメラ
- 315 ステージ移動用モーター
- 316 溶液槽
- 317 供給装置
- 318 PCR反応機能つき分配器
- 319 キャピラリー電気泳動装置
- 320 廃液溜

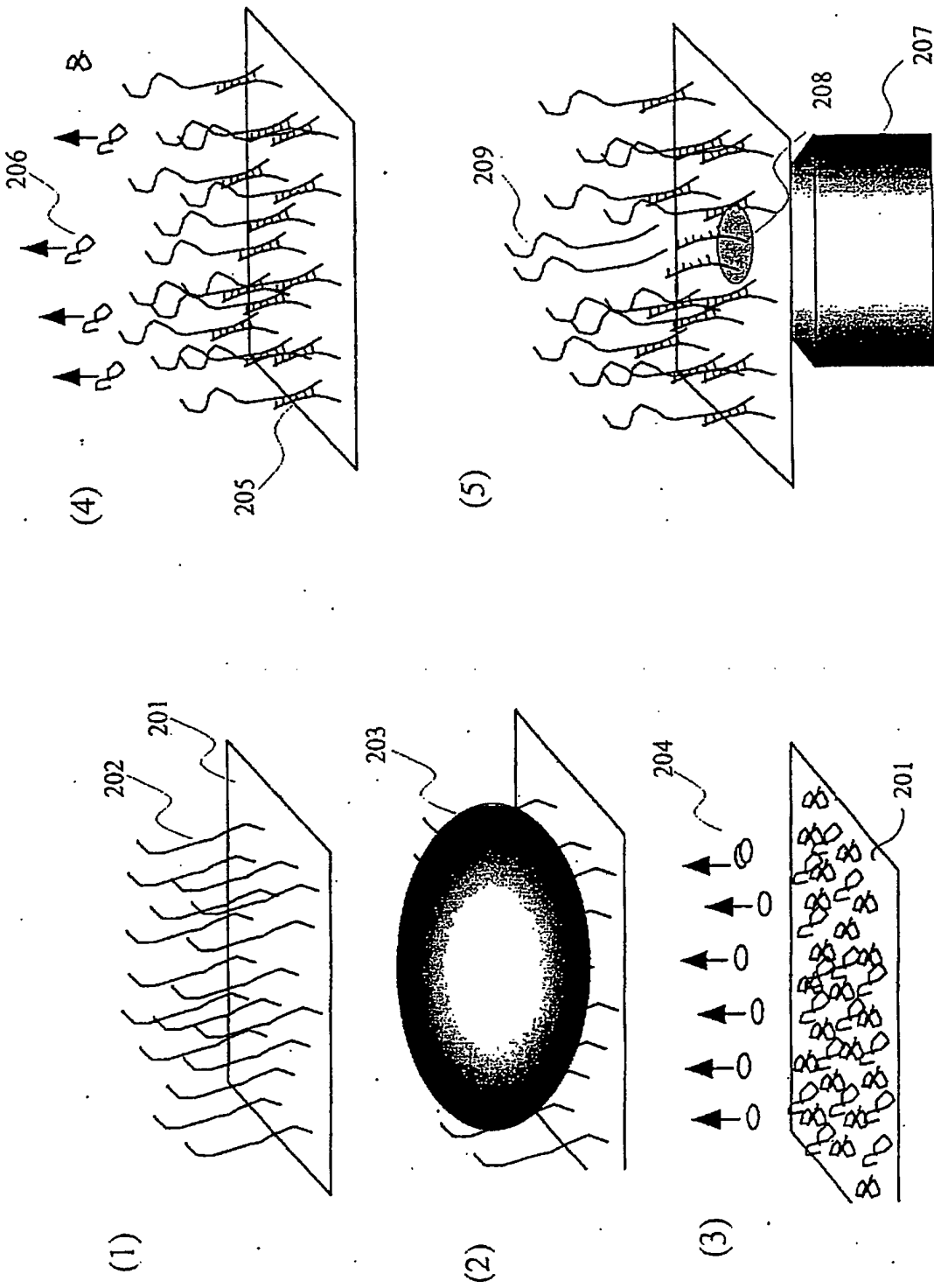
【書類名】

図面

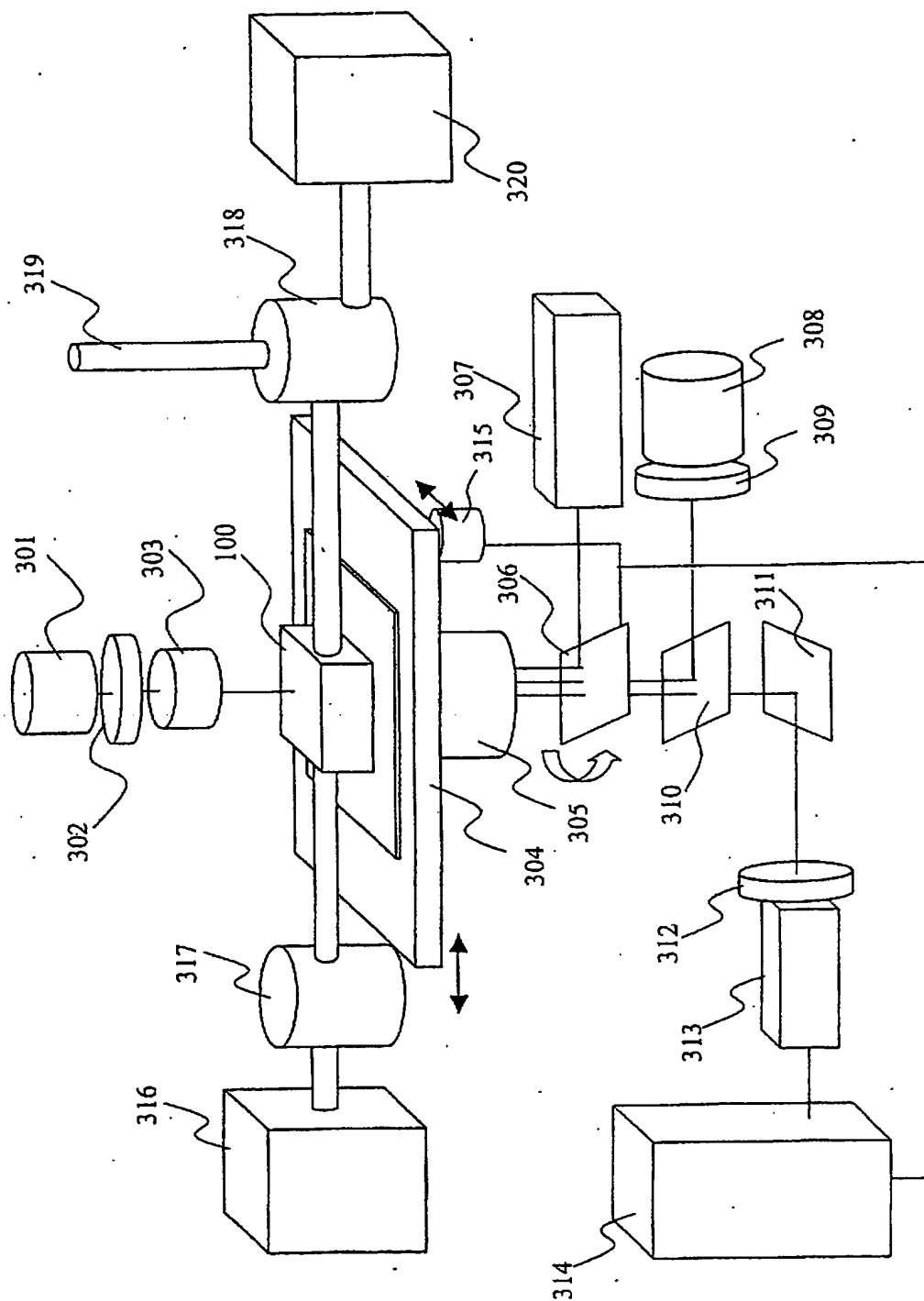
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 特定の状態にある細胞内の核酸成分の分布あるいは組織細胞集団中の各細胞内の核酸成分の分布を明らかにするために、特定の細胞状態の各細胞の特定領域の核酸成分を選択的に分離し、回収する手段を提供する。

【解決手段】 特定の波長に対して透明なガラス基板上に、積層した前記特定の波長に対して吸収を持つ領域と、前記領域が電気伝導性を持ち、前記領域に電位を印加する手段と、前記領域の上に核酸を結合させる手段と、前記領域の上に細胞を收容する容器と、その容器で細胞を培養する手段と、前記細胞を観察する手段と、前記領域に前記特定の波長の集束光が照射されることで集束光近傍のみで局所的に発熱し、その熱によって前記領域上に結合した核酸成分を局所的に解離・回収する手段とを有する。

【選択図】 図 1

特願 2002-245905

出願人履歴情報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.